

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-508987

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)10月13日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

C 1 2 N 5/08

識別記号

庁内整理番号

F I

8412-4B

C 1 2 N 5/00

E

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平4-510046  
(86) (22) 出願日 平成4年(1992)4月9日  
(85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)10月12日  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 2 8 9 5  
(87) 国際公開番号 W O 9 2 / 1 8 6 1 5  
(87) 国際公開日 平成4年(1992)10月29日  
(31) 優先権主張番号 6 8 2 , 3 4 4  
(32) 優先日 1991年4月9日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), CA, JP, US

(71) 出願人 インディアナ・ユニバーシティ・ファンデーション  
アメリカ合衆国インディアナ州47402, ブルーミントン, ビー・オー・ボックス500, ショーウォルター・ハウス (番地なし)  
(72) 発明者 ホフマン, ロナルド  
アメリカ合衆国インディアナ州46220, インディアナポリス, ノース・ペンシルバニア・ストリート 5305  
(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 造血細胞を支持するシステム及び方法

(57) 【要約】

造血原始細胞を支持するために有効な少なくとも一種のサイトカインを含み、好ましくは実質的に間質細胞を含まない培地中で造血原始細胞を支持する方法。

## 請求の範囲

1. 骨髓細胞を、實質的に間質細胞を含まず、かつ、該細胞を培養するのに有効的な少なくとも1種類のサイトカイン (cytokine) を含む培養培地中で維持する：

こととなる、培養培地中で哺乳類の骨髓細胞を培養する方法。

2. 骨髓細胞が造血幹細胞である請求項1に記載の方法。

3. 骨髓細胞が造血原始細胞である請求項1に記載の方法。

4. 骨髓細胞がCD34<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>細胞である請求項1に記載の方法。

5. 少なくとも1種類のサイトカインがIL-1；IL-3；IL-6；MGF；GM-CSF/IL-3の融合タンパク質からなる群から選択される請求項1に記載の方法。

6. 骨髓細胞を、該細胞を培養するのに効果的な複数のサイトカイン (cytokine) の組み合わせを含む培養培地中で培養する：

こととなる、培養培地中で哺乳類の骨髓細胞を培養する方法。

7. 培養培地が實質的に間質細胞を含まない、請求項6に記載の方法。

8. 骨髓細胞が造血幹細胞である請求項6に記載の方法。

9. 骨髓細胞が造血原始細胞である請求項6に記載の方法。

10. 骨髓細胞がCD34<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>細胞である請求項6に記載の方法。

11. 培養培地が下記のサイトカインの組み合わせ：IL-1とIL-3；IL-3とIL-6；IL-3とMGF；IL-3とGM-CSF；およびMGFとGM-CSF/IL-3の融合タンパク質：のうち少なくとも1つの組み合わせを含む請求項7に記載の方法。

12. 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖したCD34<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>の細胞群。

13. 7日以上15日を越えない時間で倍に増殖した請求項12に記載の細胞群。

14. 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で

倍に増殖した 細胞群の細胞群。

15. 7日以上15日を越えない時間で倍に増殖した請求項14に記載の細胞群。

16. 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖した造血幹細胞の細胞群。

17. 7日以上15日を越えない時間で倍に増殖した請求項16に記載の細胞群。

18. 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖した造血原始細胞の細胞群。

19. 7日以上15日を越えない時間で倍に増殖した請求項18に記載の細胞群。

20. 實質上間質細胞を含まず、少なくとも1種類のサイトカインを含み、かつ、15日を越えない時間で倍に増殖した細胞群を有する哺乳類の骨髓細胞増殖培養物からなる組成物。

21. 細胞群が、7日以上15日を越えない時間で倍に増殖したものである請求項20に記載の組成物。

22. 少なくとも1種類のサイトカインがIL-1；IL-3；IL-6；MGF；GM-CSF/IL-3の融合タンパク質およびGM-CSFからなるグループから選択される請求項20に記載の組成物。

23. 複数のサイトカインの組み合わせを含み、かつ、15日を越えない時間で倍に増殖した細胞群を有する哺乳類の骨髓細胞増殖培養物からなる組成物。

24. 細胞群が、7日以上15日を越えない時間で倍に増殖したものである請求項22に記載の組成物。

25. 培養物が實質的に間質細胞を含まない請求項23に記載の組成物。

26. 培養物が、下記のサイトカインの組み合わせ：IL-1とIL-3；IL-3とIL-6；IL-3とMGF；IL-3とGM-CSF；およびMGFとGM-CSF/IL-3の融合タンパク質：のうち少なくとも1つを含む請求項23に記載の組成物。

27. 培養培地が實質的に血清を含まない、請求項1に記載の方法。

28. 培養培地がMGFを含む、請求項1に記載の方法。

29. 培養培地が實質的に血清を含まない、請求項1に記載の方法。

30. 培養培地が實質的に血清を含まない、請求項28に記載の方法。

31. 培養培地がMGFと他のサイトカインの組み合わせを含む、請求項28に記載の方法。

32. 培養培地がMGFと他のサイトカインの組み合わせを含む、請求項30に記載の方法。

33. 請求項27に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖した骨髓細胞の細胞群。

34. 請求項27に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖した造血幹細胞の細胞群。

35. 請求項27に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖した造血原始細胞の細胞群。

36. 請求項28に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖した骨髓細胞の細胞群。

37. 請求項28に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖した造血幹細胞の細胞群。

38. 請求項28に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖した造血原始細胞の細胞群。

39. 培養物がMGFを含む、請求項20に記載の組成物。

40. 培養物が實質的に血清を含まない、請求項20に記載の組成物。

41. 培養物がMGFを含む、請求項23に記載の組成物。

42. 培養物が實質的に血清を含まない、請求項23に記載の組成物。

## 明細書

## 造血細胞を支持するシステム及び方法

本出願は、1991年4月9日出願の米国出願第07/682,344号の部分継続出願である。

本発明はヒトの幹細胞を支持するシステム及び方法に関するものであり、より詳しく言えば本発明は骨髓移植患者に用いるための造血幹細胞の支持に関するものである。

哺乳動物の造血は多様な長期骨髓培養システムの利用を通じてインビトロで研究されてきた(3,10-12)。デクスター(Dexter)及び共同研究者ら(3)はネズミの系について述べており、そこではCFU-S及びCFU-GMを、より限られた期間に出現する非血球前駆体及び巨核球前駆体について数カ月間アッセイすることができた。これらの培養の維持は、内皮細胞、脂肪細胞、網膜細胞及びマクロファージから成る付着性基質細胞層の形成に依存した。これらの方法は直ちにヒト骨髓の研究に適用された。ヒトの長期培養システムにおいて、アッセイ可能な造血原始細胞が8又は9週間発生したことが報告され(10,11)、後に最高20週間発生したことが報告された(12,13)。このような培養も又、多数の不均質な骨髓細胞群が頻りに再度増殖されて基質細胞層が予め定着していることに頼っている。造血幹細胞は、より遠んだ原始細胞を発生及び放出する前に、この付着性細胞の多重層に存在し付着していることが示されている(1,14,15)。基質細胞は、幹細胞がそこに存在するための物理的マトリックスを提供するだけでなく、幹細胞の増殖及び分化に必要な膜接触信号及び/又は造血成長因子を生産すると考えられる(4,5,16,17)。付着性細胞層を含むこの不均質細胞混合物は本質的に複雑な系を提供し、幹細胞の成長に影響を及ぼす別々の要因をこの系から単離することは困難であることが判明している。

最近、ヒト骨髓細胞に対する組換えヒト幹細胞因子(MGF)の単独及び組み換えヒトコロニー刺激因子；GM-CSF、IL-3及びエリスロポイエチンと組み合わせる刺激作用を調べる研究がマックニース及びラングレイ(McNiece and Langley)

によって行われた。その結果は、低密度の非付着性、抗体陽性CD34<sup>+</sup>細胞のM<sub>1</sub>GF刺激はM<sub>1</sub>GFが骨髄及び赤血球に分化できる原始細胞を直接刺激することを示唆している(18)。

本発明の一面に従えば、哺乳動物の骨髄細胞を支持する方法であって、そのような細胞が基質細胞を本質的に欠く培地中で維持され、そのような細胞を支持するのに有効な最低一種のサイトカインを含む方法が提供される。

本発明のこの一面の好ましい態様においては、造血幹細胞である骨髄細胞を支持する方法、造血原始細胞である骨髄細胞を支持する方法、及びCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>細胞である骨髄細胞を支持する方法が提供される。

加えて、本発明は最低一種のサイトカインが以下のサイトカイン類：インターロイキン(IL)-1、IL-3、IL-6、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、ヒト又はネズミ肥満細胞成長因子(MGF)とも呼ばれることがあるヒト又はネズミ幹細胞因子、及びGM-CSF/IL-3の融合蛋白(FP)から選択されるそのような方法を提供する。さらに、本発明はサイトカインM<sub>1</sub>GFを唯一のサイトカインとして、又は最低一種の他のサイトカインと組み合わせる含む特に好ましい態様を提供する。

本発明の他の一面に従えば、哺乳動物の骨髄細胞を支持する方法であって、そのような細胞を支持するのに有効なサイトカイン類の組合せを含む培地中でそのような細胞が維持される方法が提供される。好ましくは、骨髄細胞は基質細胞を本質的に欠く培地中で支持されることになる。

本発明の他の一面は、哺乳動物の骨髄細胞を支持する方法であって、そのような細胞が血清及び基質細胞を本質的に欠く培地中で維持される方法を提供する。このシステムは原始細胞数の好ましい増殖を可能ならしめ、どのサイトカインが原始細胞の増殖に特異的に影響を及ぼすかの同定を可能にする。

本発明の他の一面は、哺乳動物の骨髄細胞を支持する方法であって、そのような細胞が本質的に血清を含み長期無菌ヒト骨髄である培養システム中で維持される方法を提供する。このシステムはヒト原始細胞数の好ましい増殖を可能ならしめ、どのサイトカインがヒト原始細胞の増殖に特異的に影響を及ぼすかの同定を可能にする。好ましくは、該培地は本質的に基質細胞を欠いている。

原に対して陽性であり、HLA-DRに対して陰性であり、且つCD15に対しても陰性である。

とりわけ、本発明のこの一面は上記の方法に従って支持されるCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>細胞群を提供し、該細胞群は15日を越えない期間中に倍増する。好ましくは、該細胞群は7ないし15日間で倍増する。

他の一面によれば、本発明はここに述べる方法に従って支持される骨髄細胞の細胞群を提供し、該細胞群は15日を越えない期間中に倍増する。好ましくは、該細胞群は7ないし15日間で倍増する。

他の一面によれば、本発明はここに述べる方法に従って支持される造血幹細胞の細胞群を提供し、該細胞群は15日を越えない期間中に倍増する。好ましくは、該細胞群は7ないし15日間で倍増する。

他の一面によれば、本発明はここに述べる方法に従って支持される造血原始細胞の細胞群を提供し、該細胞群は15日を越えない期間中に倍増する。好ましくは、該細胞群は7ないし15日間で倍増する。

本発明の他の一面は、本質的に基質細胞を欠く増殖した骨髄細胞培養を含む組成物を提供し、該培養は最低一種のサイトカインも含有し、さらに該培養細胞群は15日を越えない期間中に倍増する。好ましくは、該細胞群は最低7日間で15日を越えない間に倍増する。

ヒトの長期骨髄培養(LTBM)は、インビトロでの持続的造血のために付着性基質細胞層の形成を必要とするものと考えられてきた。ヒト骨髄細胞のCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>群は、継続的にサイトカインが供給されるならば基質細胞なしに最長12週間まで、多系列の分化、自己再生、及びLTBMの開始が可能である。好ましくは、供給されるサイトカインはインターロイキン-3(IL-3)である。LTBMにおけるIL-3の存在下及び非存在下でのCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>細胞に対する基質細胞の作用は観察されている。基質の非存在下でのCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>細胞の懸濁培養は、IL-3が供給されるならば、高率の細胞増殖及び多系列原始細胞増殖により証明されるような10-12週間の持続的造血を特徴とした。これらの培養中には付着性の層は形成されず、1週間に上生させるにはIL-3が必要であった。このような基質フリーの培養は500から900以上のアッセイ可能なCFU-GMを12週間以上生じ、

この発明の他の好ましい態様により、造血幹細胞である骨髄細胞を支持する方法、造血原始細胞である骨髄細胞を支持する方法、及びCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>細胞である骨髄細胞を支持する方法が提供される。

好ましくは、該培地は以下のサイトカインの組合せ：IL-1/IL-3；IL-3/IL-6；IL-3/XGF；IL-3/GM-CSF；M<sub>1</sub>GF/FPの内の最低1種を含むことになる。出願人はこのような組合せが該細胞群の改良された迅速な増殖を提供することを見出した。

幹細胞及び他の原始細胞に関する“支持する”という用語は、そのような細胞を維持し及び/又は増殖させ及び/又は何らかの分化を促進させることを意味する。

以下に示すものは本発明において使用してもよいサイトカイン類の代表例である：すなわち、該細胞を支持するのに有効な量のIL-1。一般に、このような量は最低20 pg/mlであり1 ng/mlを越える必要はなく、好ましくは1 ng/mlである；該細胞を支持するのに有効な量のIL-6。一般に、このような量は最低20 pg/mlであり1 ng/mlを越える必要はなく、好ましくは1 ng/mlである；該細胞を支持するのに有効な量のIL-3。一般に、このような量は最低500 pg/mlであり2 ng/mlを越える必要はなく、好ましくは500 pg/mlである；該細胞を支持するのに有効な量のGM-CSF。一般に、このような量は最低100 pg/mlであり1 ng/mlを越える必要はなく、好ましくは200 pg/mlである；該細胞を支持するのに有効な量のM<sub>1</sub>GF。一般に、このような量は最低10 ng/mlであり50 ng/mlを越える必要はなく、好ましくは50 ng/mlである；及び、該細胞を支持するのに有効な量のFP。一般に、このような量は最低1 ng/mlであり10 ng/mlを越える必要はなく、好ましくは10 ng/mlである。このようなサイトカイン類は単独又は互いに組み合わせ使用してもよい。

基質細胞の非存在下でサイトカインを使用することは、特に哺乳動物の骨髄幹細胞、とりわけ原始細胞を増殖させるのに特に適している。本発明に従って支持される細胞は好ましくはヒトを起源とするものである。

本発明の好ましい一面に従えば、本発明に従って支持される細胞群はCD34抗

BFU-Eは1-3週間発生した。対照的に、外来性のIL-3の存在下及び非存在下の両方において、自己のCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>細胞を再添加した4週間の基質培養は、わずか6週間の間アッセイ可能なコロニー形成細胞をはるかに少ない(100-500)数しか発生せず、非付着性細胞の生産は12週間の観察期間を通じて非常に減少した。IL-3は追加したCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>細胞は再接種していない基質培養はソーティングされた細胞が加えられた培養と同様の挙動を示した。これらのデータは骨髄基質細胞が、造血幹細胞の発達及び増殖に対するサイトカインの作用を調節し、インビトロの造血の促進及び低下の両方に働く信号を精密に作り上げていることを示唆する。

本発明の別の一面は、増殖した骨髄細胞培養を含む組成物を提供し、該培養はサイトカインの組合せを含有し、さらに該培養細胞群は15日を越えない期間中に倍増したものである。好ましくは、該細胞群は最低7日間で且つ15日を越えない間に倍増したものである。該細胞培養が本質的に基質細胞を含まないことも好ましい。

先に示したように、本発明はCD34抗原に対して陽性であるがHLA-DR抗原及びCD15抗原は発現しない骨髄細胞に対して、そのような細胞群がヒトの造血幹細胞に密接に関連するものと考えられるために特に適用できるが、本発明がそのような細胞群を支持することに限定されるものではないことを理解すべきである。

本発明に従って支持される細胞は多様な方法で使用してもよい。例えば、そのような細胞は骨髄移植処置の一部として用いてもよい。

増殖させた造血幹細胞群は、悪性腫瘍、骨髄不全症、並びに先天性の代謝、免疫及び造血疾患を治療するための骨髄移植用の移植体として使用することができる。骨髄サンプルは患者から採取され、CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>細胞は密度遠心分離、逆流遠心エルトリエーション(counter flow elutriation)、モノクローナル抗体ラベル化、及び蛍光活性化細胞ソーティングによって単離される。この細胞群中の幹細胞がその後インビトロで増殖し、自己骨髄移植用の移植体として用いられることになる。該移植体は、患者が治療用の化学放射線処置を受けた後に注入されることになろう。

増殖させた幹細胞群は又、妊娠第一トリメスター期における子宮内移植に利用

することもできる。代謝及び造血疾患を持つ胎児が胎内で診断されることがある。骨髄を正常な個体から採取し、CD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> 細胞を先に述べた方法により得てインビトロで増殖させることができる。それらをその後、子宮内注射によって胎児に投与してよい。キメラが形成され、それにより臨床的異常性の部分的ながら臨床に重要な組織を導くことになる。

本発明を以下の実施例についてさらに述べるが、本発明の範囲はそれらに限定されるものではない：

#### 実施例1

##### A. 材料と方法

いずれの処置を行う場合もそれに先立ち、インディアナ医科大学のヒューマン・インベスティゲーション・コミティのガイドラインに従ってボランティア全員からインフォームド・コンセントを得た。

**細胞分離法。** 骨髄は健康なボランティアの後部腸骨髄から吸引採取した。低密度単核骨髄 (LDBM) 細胞は、ヘパリン処理した骨髄をフィコール-ペイグ (ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社、ピウスケッタウェイ、NJ) 上で 500 g、25分間、密度遠心分離して得た。LDBM細胞は PBS-EDTA (5% FBS を含有する PBS, pH 7.4, 0.01% EDTA wt/vol、及び 1.0 g/l D-グルコース) 中に懸濁し、JA-17 ローター及び標準分離チャンパー (ベックマン・インストルメント社、パロ・アルト、CA) を用いて 10 °C、1,950 rpm のローター速度のエルトリエーター・システム中に注入した。12-14 ml/min の流速で抽出し、造血前駆体が濃縮された LDBM のフラクション (FR 12-14) を文献記載のように (2) 回収した。

**高質細胞を含まない長期骨髄培養。** プラスチック製 35-mm組織培養皿に 10% FBSおよび2x10<sup>5</sup> M 1-メチルプレドニゾンを含むイスコプ培地 1 ml 中に 2x10<sup>5</sup> LDBM 細胞を接種した。培養細胞は空気中に 5% CO<sub>2</sub> を含む湿度 100% の環境下、37°Cでインキュベートし、週1回培地を全交換することにより栄養供給した。高質細胞は 4-6週までにコンフルエントに達した。該高質細胞培養にその後 1.5 00ラドで放射線照射し、培地を交換して、該培養物に自己ドナーからの 5x10<sup>4</sup> の

するために抗-CD71 抗体を利用した (7)。アイソタイプの含有に対応する非特異性骨髄腫蛋白から成る対照を、モノクローナル抗体の染色と同時に使用した。細胞は 2x10<sup>5</sup>/ml の濃度で染色し、各ステップの後に 1% BSA を含む PBSで洗浄した。該処理期間を通して、温度は 4°Cに維持された。

染色後直ちに、細胞をコウター・エビクス753 デュアルレーザー・フロー・サイトメトリー・システム (コウター・エレクトロニクス社、ハイアレア、FL) でソーティングした。テキサス・レッドはローダミン 6G ダイ・レーザーから放射される 590 nm 光によって励起させた。FITC 及びフィコエリスリンは専用の 6-ワアルゴン・レーザーからの 488 nm 波長を用いて励起させた。ソーティング・ウィンドウは前方角光散乱 (FALS) 及びテキサス・レッド蛍光に対して最初に設定した。各蛍光色素に対する陽性は、対照の蛍光の99% よりも大きい蛍光と定義した。細胞を次いで、検出可能な HLA-DR-フィコエリスリン及び CD33-FITC、CD15-FITC、又はCD71-FITC の存在又は非存在によってゲート処理した。

**造血原始細胞アッセイ。** 細胞を、イスコプ改良ダルベッコ培地中に30%FBS、5x10<sup>5</sup> M 2-メルカプトエタノール、1 U ヒト精製エリスロポエチン (50 U/mg 蛋白、トローパー社、大阪、日本)、50 U GM-CSF、及び 1.1% メチルセルロースを含む培地 1 ml の入った 35-mmプラスチック製組織培養皿 (コスター・データ・パッケージング社、ケンブリッジ、MA) 中に種々の濃度に懸濁した。該培養細胞を空気中に 5% CO<sub>2</sub> を含む湿度 100% の環境下、37°Cでインキュベートした。14日後、エリスロポエチック・バースト (BFU-E)、顆粒球-マクロファージ (CFU-GM)、及び混合系列 (CFU-GEMM) コロニーをそれらの標準的同定基準を用いて倒立顕微鏡でそのまま計数した (2)。

高増殖能コロニー形成細胞 (HPP-CFC) 由来のコロニーを培養28日目に最近発表されたマクニース (McNiece) 及び共同研究者らの基準 (8) に従って計数した。ヒトHPP-CFC 由来のコロニーは発現が遅く、主に顆粒球及びより少数の単球から成る非常に大きい (直径0.5 mm以上) コロニーであり、細胞数はしばしば50,000を超える。

懸濁培養液から除去された細胞を、ブルーノ (Bruno et al.) によって詳細

ソーティングした骨髄細胞をインキュベートした。これらの培養の培地は 1-10 日ごとに除去して新しい培地と交換した。懸濁している非付着性細胞をカウントし、原始細胞のアッセイを行った。

**長期懸濁培養。** 10% FBS を含むイスコプ培地 1 ml の入ったプラスチック製 35-mm組織培養皿に、ソーティングによって得られた 5x10<sup>5</sup>細胞を含む、高質細胞を含まない長期骨髄細胞をインキュベートし、空気中に 5% CO<sub>2</sub> を含む湿度 100% の環境下、37°Cでインキュベートした。この時点、及びその後 48 時間毎に、培養物に対照液 (1% BSA/PBS)、2.5 U/ml IL-1α、50 U/ml IL-3、75 U/ml IL-6、12.5 U/ml GM-CSF、又はそれらの組合せを加えた。7日間ごとに、培養容積の2分の1を除去し新しい培地と交換することによって培養の細胞数を半減させた。採取した培地中の細胞をカウントし、染色及び形態学試験のためにスライドに移し、種々の原始細胞に対するアッセイを行った。

**造血成長因子。** サイトカイン類は全てジェンザイム社、ボストン、MA、から入手した。組み換え IL-1α及びIL-3はそれぞれ 10<sup>6</sup> CFU/mg 蛋白の比活性を有したが、IL-6の比活性は10<sup>7</sup> CFU/mg 蛋白で、顆粒球/マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF) の比活性は 5x10<sup>7</sup> CFU/mg蛋白であった。

**2-及び3色細胞ソーティング。** FR 12-14の細胞を IgG、サブクラスのマウス・モノクローナル抗 HPCA-1 (CD34) (ペクトン・ディキンソン・イムノサイトメトリー・システムズ社、サン・ノゼ、CA) と共にインキュベートし、洗浄して、テキサス・レッドを結合させたサブクラス特異性ヤギ抗マウスIgG<sub>1</sub> (サザン・バイオテクノロジー・アソシエイツ社、バーミングハム、AL) で染色した。次いで細胞をマウス血清とインキュベートして、二次抗体上の非結合活性部位を全てブロックした。細胞を最後にフィコエリスリン結合のマウス抗 HL-A-DR 単独又は FITC 結合の CD33 (My9、コウター・イムノロジー社、ハイアレア、FL)、CD15 (Leu-M1)、或いは CD71 (転移受容体) (ペクトン・ディキンソン・イムノサイトメトリー・システムズ社) と組み合わせたもののいずれかにより染色した。CD 15は顆粒球及び単球系列の細胞上に存在し、細胞群からこれらの細胞成分を除去することを期待して抗-CD15 モノクローナル抗体を使用した (6)。CD71は活発に増殖中の細胞上に存在し、活発に増殖中の細胞をより静止状態の骨髄成分から分離

に述べられている血清溶濁法 (9) を用いて CFU-巨核球 (CFU-MK) コロニーについてアッセイした。1ポイント当たり 5x10<sup>5</sup>細胞を 35-mm培養皿中の 100 U の IL-3 を含む血清置換フィブリン・クロット 1ml中に懸濁し、空気中に 5% CO<sub>2</sub> を含む湿度 100% の環境下、37°Cでインキュベートした。18-24 日目に、培養細胞をそのまま固定し、ウサギ抗ヒト血小板膜蛋白抗血清及びフルオレセイン結合ヤギ F(ab')<sub>2</sub> 特異性抗ウサギIgG (タゴ社、バーリングガム、CA) を用いて染色し、巨核球コロニーをツァイス蛍光顕微鏡 (カール・ゼイセル社、ニューヨーク、NY) で計数した。陽性のコロニーは3個以上の蛍光細胞を持つ集団と定義した。

##### B. 実験

48時間毎に反復的にサイトカインを添加供給する液体培養系を細胞群の研究に利用した。CD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> 細胞及びCD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD71<sup>+</sup> 細胞の両方による細胞生産総数を表1及びIIに示し、時間毎のこれらの培養中のアッセイ可能なCFU-GMを表III及びIVに記録した。外来性のサイトカインの非存在下では、細胞総数は2週間未満で減衰し、アッセイ可能なCFU-GMは1又は2週間しか持続しなかった。IL-1αの反復添加はCD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> 細胞又はCD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD71<sup>+</sup> 細胞のいずれによる細胞生産総数又はCFU-GM発生も有意に増大させなかった。IL-6は、CD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD71<sup>+</sup> 細胞で開始された培養では細胞総数又はアッセイ可能なCFU-GM数を顕著に増大させた。対照的に、IL-6はCD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> 細胞で開始された培養により3週目までに細胞総数を7倍以上増加させたが、CFU-GMが検出される期間の延長は認められなかった。両方の実験対で、GM-CSFは6週間に渡って細胞生産総数の増加を促進し、その時点の細胞数は最初に接種した細胞群中に存在した数の 20-80倍を表した。アッセイ可能なCFU-GMは 3-4週間持続し、最初の細胞群中のアッセイ可能なそれを漸増的に使っていた。細胞増殖の促進、CFU-GM数の増加、及びCFU-GMがアッセイ可能な期間の延長に関して、単独で最も有効なサイトカインは IL-3 であった。CD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> 細胞及びCD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD71<sup>+</sup> 細胞は両方とも 28 日目までに細胞数の 200 倍の増加を経験し、培養中の 1 又は 2 週間後には最初の接種に存在したものと同等又は僅かに多い数のCFU-GMを含有した。アッセイ可能な原始

細胞は IL-3 を加えて維持した場合システム中に 4-5 週間生産され、生存能力のある細胞の数が 8 週目でも高く保たれた。IL-1a または IL-6 は IL-3 と組み合わせて加えるとこれらの作用を延長し増強させた。これら 2 種類のサイトカインの組合せで連続的に処理すると CFU-GM は懸濁培養液中で 8 週間後でアッセイ可能であった。付着性細胞層は 8 週間の観察期間を通じていずれの懸濁培養液中にも形成されなかった。

別の実験において、CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD71<sup>-</sup> 細胞を、IL-3 及び IL-6 の両方の組合せの存在下のこの懸濁培養システム中で成育させ、培養 7 日目から 28 日目まで CFU-MX をアッセイした。CFU-MX はこの 28 日の期間を通じて検出された (表 V)。この IL-3/IL-6 サイトカインの組合せを利用して、CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup> 細胞及び CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD71<sup>+</sup> 細胞の長期造血維持能力を CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup> 及び CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD71<sup>+</sup> 分画のそれと比較した (表 VI)。CD15 陽性細胞及び CD71 陽性細胞は両方とも 2 週間後には CFU-GM を発生しなかった。又、最初に圧倒的多数の BFU-E を含んでいた CD71 陽性群が培養中僅か 7 日後にはアッセイ可能な BFU-E を生産しなかった。

これらの懸濁培養中の細胞の観察期間中の形態学的分析から、種々のサイトカインを添加した後の、該細胞群の細胞組成の変化が明らかになった (表 VII 及び VIII)。IL-1a 及び IL-6 含有の培養は対照サンプルに非常に類似した挙動を示した。サイトカインを加えなかった培養は、1 週間後には 90-100% の芽細胞から成り、CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞はサイトカインの非存在下では 2 週間生存しなかったが、CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD71<sup>+</sup> で開始した培養は 2 週間目には 40% の芽細胞及び 60% の単球から成った。IL-1a を加えた培養は同様の細胞組成であった。IL-6 は両細胞群による顆粒球系統への何らかの分化を促進し、CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞は 2 週間目にはかなりの数の成熟顆粒球成分を生産した。GM-CSF は IL-3 と同様に、7 日目にはこれらの懸濁培養中の芽細胞のパーセンテージをかなり減少させた。CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞の GM-CSF 含有の培養は 4 週間の間は主に後骨髄球から成ったが、6 週間目には単球へのシフトが起きた。

IL-3 は、CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> または CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD71<sup>+</sup> 細胞のいずれかによって開始された懸濁培養が 3 週間目にはこの成長因子の存在下で 48% の好塩基球から成るという点から独特である (表 VII 及び VIII)。IL-1a または IL-6 の添加はこの傾向

を変化させず、IL-3 含有の培養は全て 3 週間目までには約 50% の好塩基球から成り、培養期間を通じてかなりの数の好塩基球を維持した。

該懸濁培養からの部分サンプルからアッセイした造血コロニーの細胞組成は、僅かな例外が認められたことを除けば元のソーティングされた細胞群からアッセイされたものに匹敵した。芽細胞コロニーは HPP-CFC 由来のコロニーと同様に、CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> または CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD71<sup>+</sup> 細胞の直接アッセイにより普通に得られたが、これらのコロニータイプは長期液体培養から得られた細胞の部分サンプルのその後のクローンアッセイには観察されなかった。GM コロニーサブタイプの構成比はしかしながら、ソーティングされた細胞で開始したもの又は液体培養の 7 日目から 42 日目に開始したもののいずれのアッセイにおいても可なり一致しており、おおよそ 40% が顆粒球/マクロファージ、40% が単球/マクロファージ、及び 20% が好塩基球又は好酸球のコロニーであった。これらの CFU-GM 由来のコロニーのサイズは 100 から 2,000 細胞の範囲であり、平均的なコロニーは 200 ないし 400 細胞を含んでいた。懸濁培養の 8 週間後には、単球/マクロファージコロニーがクローンアッセイで観察される主なコロニータイプであった。

表 I. 種々のサイトカインを添加した CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞の細胞生産総数

サイトカイン	日数							
	0	7	14	21	28	35	42	56
	生存能力のある細胞数 $\times 10^6$							
なし	5	1	4	0	0	0	0	0
IL-1*	5	2	2	0	0	0	0	0
IL-3*	5	53	140	591	1,085	533	678	781
IL-6*	5	3	4	36	26	16	0	0
GM-CSF*	5	8	14	44	169	213	118	0
IL-1a/IL-3	5	32	167	556	1,360	1,387	758	1,069
IL-6/IL-3	5	47	171	471	854	1,440	1,200	1,216

細胞総数 = 細胞数 / ml 培養液 / (1/2)<sup>n</sup>、但し n = それ以前の細胞数半減処理の回  
数。

- \* 2.5 U/ml 組み換えヒト IL-1a を 48 時間毎に加えた；比活性 =  $10^6$  CFU/mg 蛋白。
- \* 50 U/ml 組み換えヒト IL-3 を 48 時間毎に加えた；比活性 =  $10^6$  CFU/mg 蛋白。
- \* 75 U/ml 組み換えヒト IL-6 を 48 時間毎に加えた；比活性 =  $10^7$  CFU/mg 蛋白。
- \* 12.5 U/ml 組み換えヒト GM-CSF を 48 時間毎に加えた；比活性 =  $5 \times 10^7$  CFU/mg 蛋白。

表 II. 種々のサイトカインを添加した CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD71<sup>+</sup> 細胞の細胞生産総数

サイトカイン	日数							
	0	7	14	21	28	35	42	56
	生存能力のある細胞数 $\times 10^6$							
なし	5	1	2	0	0	0	0	0
IL-1*	5	3	0	0	0	0	0	0
IL-3*	5	40	226	964	748	1,190	1,120	851
IL-6*	5	1	2	0	0	0	0	0
GM-CSF*	5	3	34	44	45	445	438	0
IL-1a/IL-3	5	23	202	684	1,112	835	800	1,067

細胞総数 = 細胞数 / ml 培養液 / (1/2)<sup>n</sup>、但し n = それ以前の細胞数半減処理の回  
数。

- \* 2.5 U/ml 組み換えヒト IL-1a を 48 時間毎に加えた；比活性 =  $10^6$  CFU/mg 蛋白。
- \* 50 U/ml 組み換えヒト IL-3 を 48 時間毎に加えた；比活性 =  $10^6$  CFU/mg 蛋白。
- \* 75 U/ml 組み換えヒト IL-6 を 48 時間毎に加えた；比活性 =  $10^7$  CFU/mg 蛋白。
- \* 12.5 U/ml 組み換えヒト GM-CSF を 48 時間毎に加えた；比活性 =  $5 \times 10^7$  CFU/mg 蛋白。

特表平6-508987 (6)

表III. 種々のサイトカインを添加したCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞による CFU-GM 生産数

サイトカイン	週						
	1	2	3	4	5	6	7
	CFU-GM/ml 培養液						
なし	40	0	0	0	0	0	0
IL-1*	22	14	0	0	0	0	0
IL-3*	432	696	591	325	0	0	0
IL-6*	42	242	96	0	0	0	0
GM-CSF*	273	200	219	0	0	0	0
IL-1a/IL-3	254	397	444	408	139	152	64
IL-6/IL-3	98	342	236	768	864	1,080	384

CFU-GM 総数 = CFU-GM 数 / ml培養液 / (1/2)<sup>n</sup>、但し n = それ以前の細胞数半減処理の回数。

細胞は 5 x 10<sup>5</sup>/ml 接種した。初期 (0 日目) 細胞群中の CFU-GM = 355/5 x 10<sup>5</sup> 個。コロニーは 50 U/ml GM-CSF を含有するメチルセルロース中で成育させ、14 日後に計数した。

- \* 2.5 U/ml 組み換えヒト IL-1a を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10<sup>6</sup> CFU/mg 蛋白。
- \* 50 U/ml 組み換えヒト IL-3 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10<sup>6</sup> CFU/mg 蛋白。
- \* 75 U/ml 組み換えヒト IL-6 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10<sup>7</sup> CFU/mg 蛋白。
- \* 12.5 U/ml 組み換えヒト GM-CSF を 48 時間毎に加えた；比活性 = 5 x 10<sup>7</sup> CFU/mg 蛋白。

表IV. 種々のサイトカインを添加したCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD71<sup>-</sup> 細胞による CFU-GM 生産数

サイトカイン	週						
	1	2	3	4	5	6	8
	CFU-GM/ml 培養液						
なし	15	4	0	0	0	0	0
IL-1*	20	0	0	0	0	0	0
IL-3*	664	272	96	448	119	0	0
IL-6*	51	14	0	0	0	0	0
GM-CSF*	402	360	135	28	0	0	0
IL-1/IL-3	347	324	342	334	167	240	214

CFU-GM 総数 = CFU-GM 数 / ml培養液 / (1/2)<sup>n</sup>、但し n = それ以前の細胞数半減処理の回数。

細胞は 5 x 10<sup>5</sup>/ml 接種した。初期 (0 日目) 細胞群中の CFU-GM = 690/5 x 10<sup>5</sup> 個。コロニーは 50 U/ml GM-CSF を含有するメチルセルロース中で成育させ、14 日後に計数した。

- \* 2.5 U/ml 組み換えヒト IL-1a を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10<sup>6</sup> CFU/mg 蛋白。
- \* 50 U/ml 組み換えヒト IL-3 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10<sup>6</sup> CFU/mg 蛋白。
- \* 75 U/ml 組み換えヒト IL-6 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10<sup>7</sup> CFU/mg 蛋白。
- \* 12.5 U/ml 組み換えヒト GM-CSF を 48 時間毎に加えた；比活性 = 5 x 10<sup>7</sup> CFU/mg 蛋白。

表V. IL-3及びIL-6の組合せを添加したCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD71<sup>-</sup> 細胞の長期培養培養中のアッセイ可能なCFU-MK

培養日数*	CFU-MK/ml培養液*
7	42.6 ± 7.6*
14	67.6 ± 56.6
21	17.0 ± 11.8
28	20.2 ± 10.4

50 U/ml 組み換えヒト IL-3 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10<sup>6</sup> CFU/mg 蛋白。

75 U/ml 組み換えヒト IL-6 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10<sup>7</sup> CFU/mg 蛋白。

\* 培養液は 7 日毎に細胞数半減処理を行った。

\* CFU-MK は 100 U/ml IL-3 を含有する無血清フィブリン・クロット培養中でアッセイした。コロニーは培養 10-24 日目に計数した。

\* 各ポイントは 3 回のアッセイの平均 ± SD を表す。値は細胞数半減処理の効果に対する修正を行っていない。

表VI. IL-3及びIL-6の組合せにより刺激したソーティングされた細胞群による、CFU-GM及びBFU-E の生産総数

細胞群	週					
	1	2	3	4	6	8
	CFU-GM (BFU-E)/ml 培養液					
CD34 <sup>+</sup> DR <sup>-</sup> CD15 <sup>-</sup>	275(10)	286(4)	64	32	75	0
CD34 <sup>+</sup> DR <sup>-</sup> CD15 <sup>+</sup>	7(1)	26	0	0	0	0
CD34 <sup>+</sup> DR <sup>-</sup> CD71 <sup>-</sup>	220(5)	330(4)	132	18	43	0
CD34 <sup>+</sup> DR <sup>-</sup> CD71 <sup>+</sup>	13	16	0	0	0	0

CFU 総数 = CFU 数 / ml培養液 / (1/2)<sup>n</sup>、但し n = それ以前の細胞数半減処理の回数。50 U/ml 組み換えヒト IL-3；比活性 = 10<sup>6</sup> CFU/mg 蛋白及び 75 U/ml 組み換えヒト IL-6；比活性 = 10<sup>7</sup> CFU/mg 蛋白を 48 時間毎に加えた。細胞は 5 x 10<sup>5</sup>/ml 接種した。

表VII. 種々のサイトカインを添加したCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞の分別分析

サイトカイン	日	芽細胞	Pro Myelo	MM	Band	Seg	Eo	Baso	E	Mo
		%								
対照	7	100								
IL-1a *	7	100								
	14	78								22
IL-6*	7	100								
	14	27	11	9	13			38		2
	21	9		48	2	7		17		17
	28			30	4					66
GM-CSF*	7	25	24	27	3	21				
	14	9	1	46	3	21		13		7
	21	3	2	1	62	3	5	22		2
	28	6	1	43	7	3		6	2	32
	35			4						96
	42			1						99
IL-3*	7	21	44	35					1	
	14	7	7	53				33		
	21	8		44				48		
	28	5		35	3	9		35		13
	35	2		16	5	20		25		32
	42			15		2		20		63
IL-1a/IL-3	7	1	5	1	53	12	14		14	
	14	5		34	9			52		
	21	1		53	4	3		31		8
	28	1		42	12	5		32		8
	35			20				27		53
	42			8				8		84
	56							11		89

表VII. (続き)

サイトカイン	日	芽細胞	Pro	Myelo	MM	Band	Seg	EO	Baso	E	Mo
IL-6/IL-3	7	19	26	2	40	5	4		4		
	14	2	2		46	3	1		46		
	21	5	1		37	1	7		48		1
	28	4	1		37	10	8		35		5
	42	1			8	1			9		81
	56				2				3		95

分別細胞カウントは液体培養から取り出した細胞のライトーギムザ染色した細胞遠心分離標本で行った。1 サンプル当たり 200細胞を分類した；スライド上に 200未満の細胞しか見られない場合は、全てを分類した。

記号：Pro. 前骨髄球；Myelo. 骨髄球；MM. 後骨髄球；Band. 杆状型好中球；Seg. 分葉好中球；EO. 好酸球；Baso. 好塩基球；E. 赤血球；及びMo. 単球。

\* 2.5 U/ml 組み換えヒトIL-1a を48時間毎に加えた；比活性 =  $10^8$  CFU/mg 蛋白。

\* 50 U/ml 組み換えヒトIL-3を48時間毎に加えた；比活性 =  $10^8$  CFU/mg 蛋白。

\* 75 U/ml 組み換えヒトIL-6を48時間毎に加えた；比活性 =  $10^7$  CFU/mg 蛋白。

\* 12.5 U/ml 組み換えヒトGM-CSFを48時間毎に加えた；比活性 =  $5 \times 10^7$  CFU/mg 蛋白。

表VIII. 種々のサイトカインを添加したCD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD71<sup>+</sup> 細胞の分別分析

サイトカイン	日	芽細胞	Pro	Myelo	MM	Band	Seg	EO	Baso	E	Mo
%											
対照	7	90									10
	14	40									60
IL-1a *	7	82									18
IL-6*	7	43	4								13
	14	33	20								47
GM-CSF*	7	39	33		9	5	6		5		2
	14	18	5		42	3	12		20		
	21	4		1	66	9	7				4
	28	2			61	3	1	8			24
	35	14			18	8	8	9			52
	42										100
IL-3*	7	52	40		1	2	2		2	1	
	14	29	26		26	2	3		14		
	21	13	4	2	28	2	3		48		
	28	14	3		35	5	1		35		7
	35	9			20	7	6		27		31
	42	2			5	4			16	2	71
IL-1a/IL-3	7	48	42		6	2	1			2	
	14	4	1	53	4	5		33			
	21	3			44	1	1		49		2
	28	21	3		34	4	3	1	27		8
	35	3			23	4	29		20		21
	42	1			7	3	3		16		70
	56						1		8		91

分別細胞カウントは液体培養から取り出した細胞のライトーギムザ染色した細胞遠心分離標本で行った。

1 サンプル当たり 200細胞を分類した；スライド上に 200未満の細胞しか見られない場合は、全てを分類した。記号は表VII と同様のもを示す。\* 2.5 U/ml 組み換えヒトIL-1a を48時間毎に加えた；比活性 =  $10^8$  CFU/mg 蛋白。\* 50 U/ml 組み換えヒトIL-3を48時間毎に加えた；比活性 =  $10^8$  CFU/mg 蛋白。\* 75 U/ml 組み換えヒトIL-6を48時間毎に加えた；比活性 =  $10^7$  CFU/mg 蛋白。\* 12.5 U/ml 組み換えヒトGM-CSFを48時間毎に加えた；比活性 =  $5 \times 10^7$  CFU/mg 蛋白。

## 実施例2

長期骨髄培養(LTBM) を付着性細胞層の非存在下で  $5 \times 10^4$  細胞/ml のCD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> 骨髄細胞で開始し、それにネズミ肥満細胞成長因子(MGF) を単独で、又はIL-3或いはGM-CSF/IL-3 融合蛋白 (FP; ウィリアムズら (Williams et al.)、エクスペリメンタル・ヘマトロジー (Exp. Hematol.), 18巻、第615 頁、1990 年) と組み合わせて48時間毎に加えた。サイトカインを加えていない培養では、生存可能な細胞は2週間後には検出できなかったが、IL-3、FP、又はMGF を加えた培養は造血作用を10週間維持した。IL-3又はFPを単独で加えると56日目は細胞数が $10^4$  倍増加したが、MGF 及びFPの組合せは細胞数を  $10^8$  倍に増殖させた (0日目は  $5 \times 10^4$  細胞；56日目は  $5.5 \times 10^8$  細胞)。LTBM の10週間で種々のサイトカインによる処理は、総数213 個のアッセイ可能な造血原始細胞 (HPC; CFU-GM+BFU-E+CFU-ME) のインプットに対して以下の累積増加をもたらした：IL-3, 86 8:FP, 1,265; MGF, 2,006; MGF+IL-3, 4,845; MGF+FP, 155,442。MGF を単独に加えたLTBM は、IL-3又はFPを加えたLTBM よりも HPCクローニング効率が高かった。又、MGF を加えるとIL-3及びFPを含有する培養のクローニング効率が増大した。MGF の存在は、これらのサイトカインを加えた培養の最長寿命を延長することはなかった。

表IX. 種々のサイトカインを添加したCD34<sup>+</sup> DR<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> 細胞の細胞生産総数

サイトカイン	日数	生存能力のある細胞数 $\times 10^4$
	0	26
なし	5	0
IL-3*	5	140
GM-CSF*	5	100
FP*	5	1,400
MGF	5	520
GM-CSF/IL-3	5	580
MGF/GM-CSF	5	12,500
MGF/IL-3	5	1,200
MGF/FP	5	10,000

細胞総数=細胞数 /ml培養液/(1/2)<sup>n</sup>、但しn=それ以前の細胞希釈処理の回数。細胞は、細胞増殖ができるように、さらに種々の時点で数回の分析を行うために、定期的に分割した。

\* 500pg/ml 組み換えヒトIL-3を48時間毎に加えた。

\* 200.0 pg/ml 組み換えヒトGM-CSFを48時間毎に加えた。

\* 10.0 ng/ml 組み換えGM-CSF-IL-3 融合蛋白を各日毎に加えた。

100.0 ng/ml ネズミ組み換え幹細胞因子(SCGF) を48時間毎に加えた。

特表平6-508987 (8)

表X、種々のサイトカインを添加したCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞の、懸濁培養26日目の分別分析

サイトカイン	芽細胞	Pro Myelo	MM	Band	Seg	Lymph	Eo	Baso	Mo	Norm
FP	3	7	9	9	27	3	5	2	9	0
GM-CSF/IL-3	1	7	4	13	24	32	4	3	4	0
MGF	32	4	9	9	13	12	7	1	1	12
MGF/GM-CSF	21	10	15	12	14	7	5	2	3	11
MGF/IL-3	38	3	15	12	13	4	2	2	4	7
MGF/FP	37	17	16	9	9	5	1	0	6	0

分別細胞カウントは液体培養から取り出した細胞のライトーゲンザ染色した細胞遠心分離標本で行った。

1 サンプル当たり 200細胞を分類した。使用した記号は、Norm. 正赤芽球；それ以外は表VIIと同様のものを示す。サイトカインは表Iの説明に詳細に述べたものと同様の用量で加えた。

上記の数字に照らして非常に多くの修正及び変更が本発明には可能である；よって、特に記述された以外に、請求の範囲内で本発明を実施することができる。

実施例3

48時間毎に反復してサイトカインを添加供給する液体培養システムを、2人のドナーから培養された細胞群の研究に利用した。CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞の細胞生産総数を表XIに示し、これらの培養中の各時点のアッセイ可能なCFU-GMを表XIIIに記録する。外来性のサイトカインの非存在下では、細胞総数は1ないし2週間で減衰し、アッセイ可能なCFU-GMは1ないし2週間しか持続しなかった。ドナー1では、MGF/FPの組合せのサイトカインは8週間に渡り細胞生産総数の増加を促進し、その時点での細胞数は最初に接種した細胞群中に存在した数の  $110 \times 10^6$  倍以上を表していた。ドナー2では、同じ組合せのサイトカインは6週間に渡り

細胞生産総数の増加を促進し、その時点での細胞数は最初に接種した細胞群中に存在した数の  $16 \times 10^6$  倍以上を表していた。MGF/FPの組合せのサイトカインを加えて培養したドナー1及びドナー2におけるアッセイ可能なCFU-GMは、それぞれ6-8週間及び3-4週間持続し、最初にアッセイ可能だったCFU-GM数を有意に減っていた。

MGF/IL-3の組合せのサイトカインは細胞生産総数をドナー1では6週目に、ドナー2では8週目に最初に接種した細胞数の  $2 \times 10^6$  倍以上に増加させた。さらに、生存可能な細胞数は10週間を過ぎて高く保たれる。MGF/IL-3の組合せのサイトカインを加えて培養したドナー1及びドナー2におけるアッセイ可能なCFU-GMの増殖は各ドナーにおいて6-8週間維持され、それぞれ最初にアッセイ可能だったCFU-GM数を有意に減っていた。

CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞によるBFU-E生産総数を表XIVに示す。ドナー1及びドナー2において、MGF/FPの組合せのサイトカインではそれぞれ1-2週間及び3-4週間持続したが、ドナー2だけが最初にアッセイ可能だったBFU-E数からの有意の増加を示した。MGF/IL-3の組合せのサイトカインではドナー1において2-3週間、ドナー2において3-4週間持続し、両方とも1-2週間は最初にアッセイ可能だったBFU-E数からの有意の増加を示した。

CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞によるCFU-Mix生産総数を表XVに示す。ドナー1及びドナー2の両方においてMGF/IL-3の組合せのサイトカインは10週間を過ぎてCFU-Mixを維持し、それぞれ最初にアッセイ可能だったCFU-Mix数を有意に減っていた。ドナー1及びドナー2はそれぞれ6-8週間及び8-10週間CFU-Mixの維持を示し、両方とも最初のCFU-Mix数からの有意の増加を示した。

観察期間中におけるドナー1の懸濁培養中の細胞の形態学的分析から、種々のサイトカインを添加した後の該細胞群の細胞組成の変化が明らかになった。これを、CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞の分別分析を示す表XIIIに表している。MGF/FPを加えた培養は14日目には11%の芽細胞から成り、MGF/IL-3を加えた培養は14日目には17%の芽細胞から成った。14日目の芽細胞のパーセンテージが最も高かったのはMGFを単独で加えた培養であり、30%の芽細胞から成った。対照的に、IL-3及びFPを含有する培養では芽細胞のパーセンテージは14日目にはかなり減少してい

た。

表XIVは、原始細胞のコロニー形成ユニットを生じさせる細胞総数のパーセンテージを示している。MGFでのパーセンテージは高いが、MGFを加えた培養の全体的な増殖は実質的にない。しかしながら、MGF/IL-3サイトカインを加えた培養は高いプレーティング・パーセンテージ及び実質的な全体的増殖をもたらす(表XI-XVを参照のこと)。

表XI、種々のサイトカインの非存在下で培養されたCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞の細胞生産総数

サイトカイン	生存可能細胞数 $\times 10^6/\text{ml}$						
	週						
	1	2	3	4	6	8	10
<b>ドナー 1</b>							
なし	1	0	0	0	0	0	0
IL-3 <sup>a</sup>	28	144	271	560	480	762	980
GM-CSF <sup>a</sup>	12	107	436	1,065	2,080	2,080	1,760
IL-3/GM-CSF	23	244	742	1,620	1,979	2,035	2,720
FP <sup>a</sup>	42	262	587	1,240	3,000	1,494	480
MGF <sup>a</sup>	8	104	933	N.D. <sup>b</sup>	1,680	1,760	640
MGF/FP	101	1,211	35,100	101,000	262,400	550,000	100,000
MGF/IL-3	38	213	978	2,820	10,800	3,680	5,120
<b>ドナー 2</b>							
なし	1	0	0	0	0	0	0
IL-3	24	180	650	605	1,400	960	864
FP	41	810	2,100	6,680	1,840	4,320	5,280
MGF	8	27	71	98	230	70	0

MGF/FP	100	1,280	15,700	6,400	81,000	19,520	0
MGF/IL-3	36	305	780	1,380	6,960	10,400	5,440

ドナー 3

MGF/FP	N.D.	5,040	14,400	14,800	8,960		
--------	------	-------	--------	--------	-------	--	--

全細胞=細胞/ml培養物/(n)<sup>a</sup> (但しn=それ以前の細胞数半減処理の回数である)

培養物は  $5 \times 10^6$  細胞/mlで接種した。

<sup>a</sup> 500 pg/ml超換え体ヒトIL-3を48時間毎に添加した；

比活性  $3.5 \times 10^6$  CFU/mg 蛋白質

<sup>a</sup> 250 pg/ml超換え体ヒトGM-CSFを48時間毎に添加した；

比活性  $2 \times 10^6$  CFU/mg 蛋白質

<sup>a</sup> 10ng/ml超換え体ヒトFPを48時間毎に添加した；

比活性  $1.2 \times 10^6$  CFU/mg 蛋白質

<sup>a</sup> 50ng/ml超換え体ネズミMGFを48時間毎に添加した；

比活性  $10^6$  CFU/mg 蛋白質

<sup>b</sup> N.D. 検出せず



特表平6-508987 (9)

\* 50ng/ml 超換え体ネズミMGF、比活性 $10^6$  CFU/mg 蛋白質

表 XII

様々なサイトカインで培養後のCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>細胞の分別分析

サイトカイン	日	芽細胞	Pro	Myelo	Meta	Band	Seg	Baso	Eos	Mono
POST SORT	0	82	1	1				6		10
IL-3 <sup>a</sup>	7	10	8	16	2		9	50	2	3
	14	2	4	39	4	3	10	28		10
	28	3	6	13	3	1	6	61		7
PP <sup>a</sup>	7	10	21	52	5		2	7		3
	14	1	4	17	8	3	20	14		33
	28		1	24	7	4	36	8		20
MGF <sup>a</sup>	7	54	39	3				1		3
	14	30	38	9	1	1		1		20
	28	1	7	21	18	13	15	1	1	23
MGF/PP	7	29	22	23	3		4	18		1
	14	11	22	16	4	2	4	13		28
	28	1	8	13	12	2	10	2		52
MGF/IL-3	7	31	15	48			2	4		
	14	17	14	9	2	4	6	34		12
	28		8	46	17	2	17	2		8

分化細胞計測は、培養液から取り出した細胞のライトーゲムサ染色細胞の遠心分離標本において行われた。 $\geq 100$ 細胞/サンプルを分類した。記号: Pro 前骨髄球; Myelo 骨髄球; Meta 後骨髄球; Band 杆状型好中球; Seg 分葉好中球; Baso 好塩基球; Eos 好酸球; Mono 単球。

<sup>a</sup> 500 pg/ml超換え体ヒトIL-3、比活性 $3.5 \times 10^6$  CFU/mg 蛋白質

<sup>a</sup> 10ng/ml 超換え体ヒトPP、比活性 $1-2 \times 10^6$  CFU/mg 蛋白質

表 XIII

様々なサイトカインの存在下に培養されたCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>細胞による全CFU-GM産生 CFU-GM/ml 培養物<sup>a</sup>

サイトカイン	1	2	3	4	6	8
ドナー 1						
なし	8	0	0	0	0	0
IL-3 <sup>a</sup>	132	28	80	N.D. <sup>a</sup>	N.D.	128
GM-CSF <sup>a</sup>	192	112	88	N.D.	128	0
IL-3/GM-CSF	186	104	36	N.D.	128	576
PP <sup>a</sup>	86	112	128	176	N.D.	64
MGF <sup>a</sup>	290	396	808	448	96	0
MGF/PP	370	1,600	14,800	38,000	80,000	0
MGF/IL-3	144	348	104	416	2,528	192
ドナー 2						
なし	0	0	0	0	0	N.D.
IL-3	232	196	98	16	64	N.D.
PP	84	148	288	320	544	N.D.
MGF	108	152	380	64	128	N.D.
MGF/PP	114	1,440	10,600	N.D.	N.D.	N.D.
MGF/IL-3	82	240	504	32	1,024	N.D.

ドナー 3

MGF/PP	N.D.	12,448	32,264	32,264	1,254	0
--------	------	--------	--------	--------	-------	---

全CFU-GM=CFU-GM/ml培養物/ (n) \* (但しn=それ以前の細胞数半減処理の回数である)

<sup>a</sup> 培養物に  $5 \times 10^4$  細胞/ml で接種した。初期細胞群におけるCFU-GM/ $5 \times 10^4$  細胞: ドナー 1, 150; ドナー 2, 227; ドナー 3, 144。コロニーを500 pg/mlGM-CSF および1 U ヒト尿酸エリトロポエチンを含むメチルセルロース中で増殖させ、14日後に数えた。

<sup>a</sup> 500 pg/ml超換え体ヒトIL-3を48時間毎に添加した;

比活性  $3.5 \times 10^6$  CFU/mg蛋白質

<sup>a</sup> 250 pg/ml超換え体ヒトGM-CSFを48時間毎に添加した;

比活性  $2 \times 10^6$  CFU/mg蛋白質

<sup>a</sup> 10ng/ml 超換え体ヒトPPを48時間毎に添加した;

比活性  $1-2 \times 10^6$  CFU/mg蛋白質

<sup>a</sup> ng/ml 超換え体ネズミMGFを48時間毎に添加した;

比活性  $10^6$  CFU/mg蛋白質

<sup>a</sup> N.D.-検出せず

表 XIV

様々なサイトカインの存在下において培養されたCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>細胞による全BFU-E 産生 BFU-E/ml培養物<sup>a</sup>

サイトカイン	1	2	3	4
ドナー 1				
なし	0	-	-	-
IL-3	24	0	0	0
GM-CSF	8	0	0	0
IL-3/GM-CSF	22	4	0	0
PP	20	4	0	0
MGF	8	40	0	0
MGF/PP	98	0	0	0
MGF/IL-3	238	4	0	0
ドナー 2				
C	0	-	-	-
IL-3	40	28	0	0
PP	132	68	56	16
MGF	6	0	0	0
MGF/PP	662	100	200	0
MGF/IL-3	1,062	272	40	0

全BFU-E =BFU-E /ml 培養物/ (N) \* (但しn=それ以前の細胞数半減処理の回数である)

<sup>a</sup> 培養物に  $5 \times 10^4$  細胞/ml で接種した。各点は二つの別々の実験の平均値を表

特表平6-508987(10)

す。初期細胞群において、平均BFU-E/  $5 \times 10^4$  細胞：ドナー 1, 173; ドナー 2, 134。コロニーを500 pg/ml GM-CSFおよび1 U/ml ヒト原エリスロポエチンを含むメチルセルロース中で増殖させ、12日後に数えた。

\* 500 pg/ml 組換え体ヒトIL-3を48時間毎に添加した；  
比活性  $3.5 \times 10^4$  CFU/mg 蛋白質

\* 250 pg/ml 組換え体ヒトGM-CSFを48時間毎に添加した；  
比活性  $2 \times 10^4$  CFU/mg 蛋白質

\* 10ng/ml 組換え体ヒトPPを48時間毎に添加した；  
比活性  $1-2 \times 10^4$  CFU/mg 蛋白質

\* 50ng/ml 組換え体ネズミMGFを48時間毎に添加した；  
比活性  $10^4$  CFU/mg 蛋白質

表 IV

様々なサイトカインの存在下において培養されたCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞による全CFU-ME産生  
CFU-ME/ml 培養物<sup>1</sup>

サイトカイン	濃					
	2	3	4	5	8	10
	ドナー 1					
なし	0	0	0	0	0	1
IL-3*	14	74	100	118	48	N.D.*
GM-CSF*	12	40	20	48	32	0
IL-3/GM-CSF	20	80	96	120	N.D.	N.D.
PP*	28	120	184	118	96	64
MGF*	6	12	36	20	0	0
MGF/PP	40	120	120	120	N.D.	0
MGF/IL-3	26	90	208	220	128	64

サイトカイン	濃					
	1	2	3	4	6	8
	プレーティング効率 <sup>1</sup> (%)					
なし	N.D.*	-	-	-	-	-
IL-3*	0.86	0.072	0.023	0.003	0.005	0.009
GM-CSF*	1.67	0.105	0.020	N.D.	0.005	0.000
IL-3/GM-CSF	0.96	0.044	0.005	N.D.	0.006	0.028
PP*	0.42	0.039	0.019	0.010	0.015	0.002
MGF*	2.58	0.493	0.580	0.065	0.031	0.000
MGF/PP	0.65	0.127	0.056	0.029	0.015	0.000
MGF/IL-3	2.10	0.173	0.041	0.008	0.019	0.002

<sup>1</sup> プレーティング効率=計測されたコロニー/培養した細胞×100%。各時点での細胞を計測し、500 pg/ml GM-CSF および1 U/ml ヒト原エリスロポエチンを含むメチルセルロースまたは1ng IL-3を含むフィブリンクロット中で培養し、14日目に測定した。各点は2〜4回の別々の実験の平均値である。初期(0日)細胞群の平均クローニング効率: 4.54%

\* 500 pg/ml 組換え体ヒトIL-3を48時間毎に添加した；  
比活性  $3.5 \times 10^4$  CFU/mg 蛋白質

\* 250 pg/ml 組換え体ヒトGM-CSFを48時間毎に添加した；  
比活性  $2 \times 10^4$  CFU/mg 蛋白質

\* 10ng/ml 組換え体ヒトPPを48時間毎に添加した；  
比活性  $1-2 \times 10^4$  CFU/mg 蛋白質

\* 100ng/ml 組換え体ネズミMGFを48時間毎に添加した；  
比活性  $10^4$  CFU/mg 蛋白質

\* N.D. 検出せず

	ドナー 2					
	8	0	0	0	0	0
なし	8	0	0	0	0	0
IL-3	26	100	140	140	64	64
GM-CSF	24	40	60	80	32	0
IL-3/GM-CSF	40	120	160	200	64	64
PP	56	120	200	200	96	64
MGF	10	3	60	60	0	0
MGF/PP	56	200	200	200	40	0
MGF/IL-3	34	120	240	260	160	192

全CFU-ME=CFU-ME/ml 培養物/ (N) × (但しn=それ以前の細胞数半減処理の回数である)

<sup>1</sup> 培養物は  $5 \times 10^4$  細胞/ml で接種した。各点は二つの別々の実験の平均を表す。初期細胞群における、平均CFU-ME/  $5 \times 10^4$  細胞=0。コロニーを1ng IL-3を含むフィブリンクロット中で培養し、18日後に数えた。

\* 1 ng/ml 組換え体ヒトIL-3を48時間毎に添加した；  
比活性  $3.5 \times 10^4$  CFU/mg 蛋白質

\* 250 pg/ml 組換え体ヒトGM-CSFを48時間毎に添加した；  
比活性  $2 \times 10^4$  CFU/mg 蛋白質

\* 10ng/ml 組換え体ヒトPPを48時間毎に添加した；  
比活性  $1-2 \times 10^4$  CFU/mg 蛋白質

\* 100ng/ml 組換え体ネズミMGFを48時間毎に添加した；  
比活性  $10^4$  CFU/mg 蛋白質

\* 検出せず

#### 実施例 4

血清不含有長期懸濁ヒト骨髓培養系。血清不含有培地は、ボンティングら(19)によりすでに既述されているように製造された。血清不含有および血清含有培地は両方ともCD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞で開始し、48時間毎にILおよびGM-CSF/IL-3融合分子(PP)を添加した。

表XVIIで明らかのように、血清不含有培地に維持された培養物は、比較血清含有培地で観察されたよりも全細胞産生量が非常に低いことが特徴的であった。6週間の観察期間にわたって、これらのLTBMCsは、全細胞数で単に24倍の増加を示したにすぎないが、それでもCFU-GMでは6倍の増加およびHPP-CFCでは1.8倍の増加が特徴的であった。しかしながら、注目すべきことに、血清不含有培地における原始細胞クローニング効率は、LTBMCの28日後に1.4%であった(表XVII)のに対して、比較的血清含有培地では0.03%のクローニング効率であった。これらの研究により、血清不含有培養系はさらに分化した細胞の産生を誘導することを犠牲にするが原始細胞数を増殖するために好ましいことが示された。

表 XVII\*

培養日数	細胞数 ×10 <sup>5</sup>	原始細胞	
		CFU-GM	HPP-CFC
0	10	375	40
14	30	744	9
28	70	1,050	21
42	140	140	42

\* CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> 細胞は血清不含有培地に懸濁し、48時間毎にIL 100ng/ml およびPP 10 ng/ml を添加した。

## 参考文献

1. Gordon, M.Y., C.R. Dowling, G.P. Riley, and M.P. Greaves. 1987. *J. Cell. Physiol.* 120:150-158.
2. Brandt, J.E., N. Baird, L. Lu, E. Srouf, and R. Hoffman. 1988. *J. Clin. Invest.* 82:1017-1027.
3. Dexter, T.M., T.D. Allen, and L.G. Lejtha. 1977. *J. Cell. Physiol.* 91:335-344.
4. Roberts, R.A., E. Spooner, B.K. Parkinson, B.I. Lord, T.D. Allen, and T.M. Dexter. 1987. *J. Cell. Physiol.* 132:203-214.
5. Eliason, J.P., B. Thorens, V. Kindler, and P. Vassalli. 1988. *Exp. Hematol.* 16:307-312.
6. Strauss, L.C., R.E. Stuart, and C.I. Civin. 1983. *Blood.* 61:1222-1231.
7. Sieff, C., D. Bicknell, G. Ceine, J. Robinson, C. Lam, and M.P. Greaves. 1982. *Blood.* 60:703-713.
8. McNeice, I.K., F.M. Stewart, D.M. Dencon, D.S. Teweleess, K.M. Zeebo, S.C. Clark, and P.J. Quesenberry. 1988. *Blood.* 74:609-612.
9. Brno, E., R. Briddell, and R. Hoffman. 1988. *Exp. Hematol.* 16:371-377.
10. Moore, M.A.S., and A.P.C. Sheridan. 1979. *Blood Cells.* 5:297-311.
11. Bocking, W.G., and D.W. Golde. 1980. *Blood.* 56:118-124.
12. Gartner, S., and H.S. Kaplan. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:4758-4759.
13. Skowick, F.T., C.M. Abbad, J.K. Brennan, and M.A. Lichtman. 1984. *Exp. Hematol.* 12:327-338.
14. Goulombel, L., A.C. Euves, and C.J. Euves. 1983. *Blood.* 62:291-297.

補正書の翻訳文提出書  
(特許法第184条の7第1項)

平成 5年10月12日

特許庁長官 麻生 渡 殿

## 1. 特許出願の表示

PCT/US92/02895

## 2. 発明の名称

造血細胞を支持するシステム及び方法

## 3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国インディアナ州47402, ブルーミントン,  
ビー・オー・ボックス 500, ショーウォルター・ハウス  
(番地なし)

名称 インディアナ・ユニバーシティ・ファンデーション

## 4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル 206区  
電話 3270-6641-6646  
氏名 (2770) 弁護士 湯浅 恭三

## 5. 補正書の提出日

平成 4年 9月 2日

## 6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文 1通

15. Gordon, M.Y., J.A. Bibben, S. Dowling, R.C. Gordon-Smith, and J.M. Goldman. 1985. *Exp. Hematol.* 13:937-940.
16. Li, D.L., and G.R. Johnson. 1985. *Nature (Lond.)* 318:833-838.
17. Tsai, S., C.A. Sieff, and D.G. Nathan. 1986. *Blood.* 67:1418-1426.
18. McNeice, I.K., Langley, K.E., and Zeebo, K.M. 1991. *Exp. Hematol.* 19:226-231.
19. Ponting, I.K.D., Heyworth, C.M., Cormier, F. and Dexter, T.M., 4:165-173, 1991.

## 19条補正

(請求の範囲全文の差し替え)

## 請求の範囲

1. 骨髓細胞を、實質的に間質細胞を含まず、實質的に血清を含まず、かつ、MGFと少なくとも1種類の他のサイトカイン(cytokine)との、該細胞を培養するのに有効な組み合わせを含む培養培地中で維持することによる、培養培地中で哺乳類の骨髓細胞を培養する方法。
2. 骨髓細胞が造血幹細胞である請求項1に記載の方法。
3. 骨髓細胞が造血原始細胞である請求項1に記載の方法。
4. 骨髓細胞がCD34<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>細胞である請求項1に記載の方法。
5. 少なくとも1種類の他のサイトカインがIL-1:IL-3:IL-6:GM-CSF/IL-8の融合タンパク質からなる群から選択される請求項1に記載の方法。
6. 骨髓細胞を、實質的に血清を含まず、かつ、該細胞を培養するのに効果的な、MGFを含む複数のサイトカイン(cytokine)の組み合わせを含む培養培地中で培養することによる、培養培地中で哺乳類の骨髓細胞を培養する方法。
7. 培養培地が實質的に間質細胞を含まない、請求項6に記載の方法。
8. 骨髓細胞が造血幹細胞である請求項6に記載の方法。
9. 骨髓細胞が造血原始細胞である請求項6に記載の方法。
10. 骨髓細胞がCD34<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>細胞である請求項6に記載の方法。
11. 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖したCD34<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>の細胞群。
12. 7日以上15日を越えない時間で倍に増殖した請求項11に記載の細胞群。
13. 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で

25. 培養物が、下記のサイトカインの組み合わせ: IL-3とMGF; およびMGFとGM-CSF/IL-3の融合タンパク質: のうち少なくとも1つを含む培養液2.3に配製の製成物。

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IN ACCORD WITH INTERNATIONAL AGREEMENTS, INCLUDING AET</b> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classifications and IPC IPC CL.: C12N 5/268 ON CL.: G15/248.3		
<b>II. SUBJECT SEARCHED</b> Minimum Documentation Searched <sup>1</sup> Classification Range: _____ Clearing-up Signs & Symbols: U.S.E. 439/240.1		
Documents Examined other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Public Search <sup>2</sup>  APS. Dialog		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT<sup>3</sup></b>		
Category	Citation of Document <sup>4</sup> , with indication, where appropriate, of the relevant paragraph <sup>5</sup>	Relevant to Claim No., " "
X	J. Clin. Invest., Vol. 66, Issued September 1980, J. Brandt et al., "Cytokine-dependent long-term culture of highly enriched precursors of hematopoietic progenitor cells from human bone marrow," pages 922-931, see entire document.	1-28
X/Y	Eur. Patent., Vol. 18, Issued 1990, D.W. Williams et al., "Isolation biological activity of a human GM-CSF/IL-3 fusogen protein," page 619, see entire document.  Blood, Vol. 64, No. 3, Issued August 1984, R. J. Quakelet et al., "Hematopoietic regulatory factors produced in long-term mouse bone marrow cultures and the effect of in vitro irradiation," pages 814-829, see entire document.	1-30/1-28  1-28
Y	Blood, Vol. 72, No. 7, Issued 15 May 1989, W. Kobayashi et al., "Interleukin-7 is significantly more effective than other colony-inducing factors in long-term maintenance of human bone marrow-derived colony-forming cells in vitro," pages 1836-1841, see entire document.	1-39
<b>IV. SUMMARY INFORMATION OF cited documents<sup>6</sup></b>		
"A"	document defining the general state of art which is less comprehensive in its particular relevance	"1"
"B"	document which has been studied in or after the international filing date	"X"
"C"	document published prior to the international filing date and which it aims to establish the publication date of modification of the invention	"P"
"D"	document published prior to the international filing date and which it aims to establish the publication date of modification of the invention	"E"
"F"	document published prior to the international filing date and which it aims to establish the publication date of modification of the invention	"G"
<b>V. CERTIFICATION</b> Date of the Actual Completion of the International Search <sup>7</sup> : 15 June 1992 International Searching Authority <sup>8</sup> : ISA/GS		
Date of the Actual Completion of the National Search Report <sup>9</sup> : 01 JUL 1992 Signature of Authorized Official <sup>10</sup> : [Signature] KAREN COCHRANE CARLSON, PH.D.		

International Application No. PCT/US93/03993

FURTHER INFORMATION CONTAINED FROM THE SECOND SHEET

X.P	Blood Cells, Vol. 37, No. 2, issued 29 April 1991, E. F. Scour et al., "Human CD34+HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis", pages 287-295, see entire document.	1-26, 29
X.P	J. Immunol., Vol. 146, No. 3, issued 01 February 1992, E. F. Scour et al., "Relationship between cytokine-dependent cell cycle progression and MHC class II antigen expression by human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells", pages 819-820, see entire document.	1-26, 29

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE

1. ☐ Claim numbers \_\_\_\_\_, because they relate to subject matter (1) not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers \_\_\_\_\_, because they relate to parts of the international application that do not comply with the procedural requirements to such an extent that an international search can be carried out (1), specifically:

3. ☐ Claim numbers \_\_\_\_\_, because they are dependent claims not drafted in accordance with the request and draft summary of PCT Rule 8.2Aa.

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

☐ As of the date of international search fees were directly paid by the applicant, this international search report contains all search results of the international application.

☐ As only some of the international application fees were directly paid by the applicant, this international search report contains only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

☐ An international search report four were directly paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is excluded by claim numbers:

☐ As of the date of international search fees were directly paid by the applicant, this international search report contains all search results of any additional fee.

☐ The international search fees were not accompanied by results or a priority.

☒ No search accompanied the payment of additional search fees.

PCT/US93/03993, International Application No. PCT/US93/03993

B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT SCOTCHMAN FROM THE SECOND SHEET		
Category	Citation of Document <sup>12</sup> with indication, where appropriate, of the relevant language <sup>13</sup>	Reference to Other No.
X.P	Blood, Vol. 79, No. 3, issued 01 February 1992, J. Brandt et al., "Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells", pages 634-641. see entire document.	1-28

フロントページの続き

(72)発明者 ブラント、ジョン  
アメリカ合衆国インディアナ州46220、イ  
ンディアナポリス、ダグラス・ロード  
6312